

PCR法を用いた清酒酵母と独自の酵母の簡易識別

都築 正男^{*1)}, 大橋 正孝^{*1)}, 清水 浩美^{*1)}

A Simple PCR Method for Differentiation of Sake Yeast Strains and Original Strains

TSUDUKI Masao^{*1)}, OHASHI Masataka^{*1)}, SHIMIZU Hiromi^{*1)}

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、清酒をはじめ、焼酎、ワイン、ビール、パンなど多くの発酵食品で多様な菌株が使用されている。近年、清酒用酵母に関して、全国各地で独自の清酒酵母を分離する試みがなされているが、奈良県においても、独自の酵母として「奈良八重桜酵母」が得られており、今後もこのような試みがなされることが考えられる。菌株の分離・維持や醸造工程の管理などには酵母の菌株判別が重要である。そこで県内の酒造会社で多用されている協会酵母 (K701号, K901号) と独自の酵母を、簡便に識別するためにPCR法を用いた方法を試みた。

1. 緒言

日本の清酒消費量は昭和50年以降、ほぼ右肩下がりで減少しており、平成24年には593千Lと約35%まで減少している¹⁾。これは消費者の嗜好の変化の対応が不十分であることが要因の一つとしてあげられる。この状況に対応するため、全国各地で新しい酵母を分離し、様々な特徴を持った清酒の開発が進められている。奈良県においても独自の酵母の分離が試みられ、「奈良八重桜酵母」を得ることができており²⁾、今後もこのような独自の酵母の分離が行われるものと考えられる。酵母の分離時のスクリーニングや、新たに分離された酵母を維持・管理すること、酒質を維持するために製造工程で酵母の純度を管理することは、重要な課題である。

従来、清酒酵母を識別するために主に生化学的性質を利用した手法が主に用いられており、現在でも有用な方法として使用されている。TTC染色やβ-アラニン培地などよく用いられるが、菌株が異なっても性質が似通うと判別できない可能性がある。そこで近年、遺伝子を用いた手法の開発が進められている³⁾。本研究では、PCR法を利用した遺伝子型の解析を行い、奈良県内でよく利用されている協会酵母と識別することを試みた。

2. 実験方法

2.1 供試酵母

奈良県内で用いられる主な清酒醸造用の酵母としてK701、K901 (日本醸造協会) を用い、協会酵母以外の酵母として、奈良八重桜酵母及び県内で単離した野生酵母2株を使用した。また、日本酒用以外の酵母として、ブドウ酒用4号、焼酎用2号 (日本醸造協会) を用いた。

2.2 遺伝子型の解析

2.2.1 DNAの調製

YPD培地で30°C・1日間培養後、GenとるくんTM (酵母用) High Recovery (タカラバイオ社製) を用いて染色体DNAを調製し、TE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA・2Na) に溶解した。

2.2.2 プライマー

遺伝子型の解析には2種類の領域をPCRで増幅して試験を行った。一つ目はAWA1遺伝子で、プライマーは5'-ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTACCGCC-3'及び5'-TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC-3'を用いた⁴⁾。二つ目は長鎖末端反復配列 (LTR) の一つYLRWdelta20で5'-TCACGTCAGAATAGTTTTTGTGCACTATG-3'及び5'-AAATGGATGGATAATTTGATAATTGCTGGG-3'を用いた⁵⁾。

2.2.3 PCR反応条件

PCRの反応液は、Ex TaqTM (タカラバイオ社製) を0.125 μL, 10×Ex Taq buffer を2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) を2 μL, プライマー (10 μM) を2.5 μL に鋳型DNAを<0.5 μgを加え、滅菌水で25 μLに調製した。

PCRはVeriti Thermal Cycler (ライフテクノロジーズ社製) を用いて、94°C, 3分間でDNAの変性を行った後、94°Cで1分 (変性), 60°Cで1分 (アニーリング), 72°Cで5分 (伸長) を30サイクル行った。

PCR産物は、1%アガロースゲルを用いて100Vで約30分間、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。

*1) バイオ・食品グループ

3. 結果及び考察

3.1 AWA1 遺伝子の遺伝子型

AWA1 遺伝子を PCR で増幅させると, 2 種の清酒用酵母 (K701 と K901) 間で増幅される DNA 断片長が異なっており, K701 は約 6 kb, K901 は約 4 kb の大きさであった. 一方, 奈良八重桜酵母は 3.5 kb, 野生酵母は A, B ともに 3 kb であり, 清酒用の協会酵母より小さい DNA 断片であった. また, ブドウ酒用 4 号酵母は約 4 kb で K901 とほぼ同じ大きさであり, 焼酎用 2 号酵母は 3.5 kb で奈良八重桜酵母とほぼ同じ大きさであった. この結果から K701, K901 と他の酵母は AWA1 遺伝子を増幅することで, ほぼ識別可能であった. しかし, ブドウ酒用 4 号酵母と K901 が同じ大きさであったため, AWA1 遺伝子だけでは清酒用の協会酵母と区別できない酵母があり, この遺伝子だけでは菌株の判別は不十分であると考えられる.

M 1 2 3 4 5 6 7

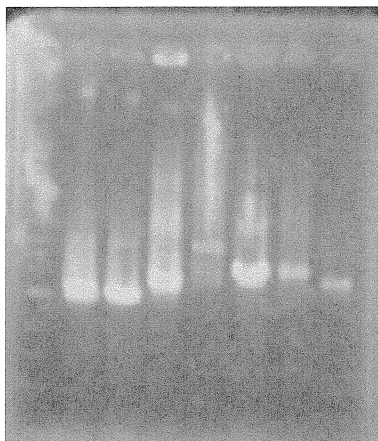


図 1 AWA1 遺伝子の PCR 産物の電気泳動

LaneM; 1 kb DNA Ladder Maker, Lane1; 野生酵母 A, Lane2; 野生酵母 B, Lane3; 奈良八重桜酵母, Lane4; K701, Lane5; K901, Lane6; ブドウ酒用4号, Lane7; 焼酎用2号.

3.2 LTR の遺伝子型

LTR の一つである YLRWdelta20 を PCR で増幅させると, 2 種の清酒用酵母 (K701 と K901) 間で増幅される断片長が異なっており, K701 は約 1.6 kb, K901 は約 7 kb の大きさであった. 野生酵母は A, B ともに約 1.6 kb で, K701 と同じ大きさであった. 一方, 奈良八重桜酵母, ブドウ酒用 4 号酵母, 焼酎用 2 号の 3 菌株では YLRWdelta20 は増幅しなかった.

この結果から, 今回用いた野生酵母や独自の酵母は, K701 型もしくは増幅しないというパターンのみであり, YLRWdelta20 だけでは菌株の区別はできず, 協会酵母との識別も不完全であった. しかし, 今回使用した酵母では, AWA1 遺伝子と YLRWdelta20 を組み合わせることにより, K701 及び K901 とその他の酵母との識別が可能であった.

以上のことから, AWA1 と YLRWdelta20 の PCR 産物は,

K701・K901 か否かを簡易的に識別するのに有用であると考えられる. 一方, K701・K901 以外の酵母間では, 奈良八重桜酵母と焼酎用 2 号酵母や野生酵母 A と B のように, AWA1 遺伝子と YLRWdelta20 だけでは同じ泳動パターンになっているものがある. これらの識別を正確に行うためには, DNA 上の他の領域を PCR することやパルスフィールドゲル電気泳動等で識別する必要があると考えられる.

M 1 2 3 4 5 6 7

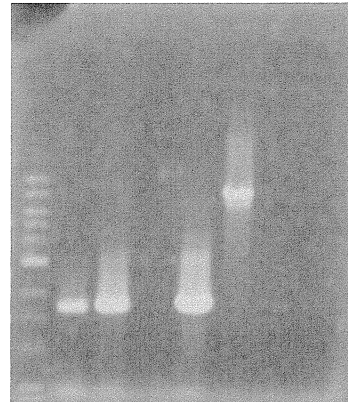


図 2 YLRW delta20 の PCR 産物の電気泳動

LaneM; 1 kb DNA Ladder Maker, Lane1; 野生酵母 A, Lane2; 野生酵母 B, Lane3; 奈良八重桜酵母, Lane4; K701, Lane5; K901, Lane6; ブドウ酒用4号, Lane7; 焼酎用2号.

4. 結言

本研究では清酒用の協会酵母とその他の酵母を区別するための簡易識別法の検討を行った. その結果, PCR 法で AWA1 と LTR の一つ YLRWdelta20 を増幅することで K701 及び K901 と他の酵母を簡易的に識別することができた. 独自の酵母を分離する場合, 菌株の識別には多くの時間と労力を要するが, 本法を一次選択として用いることで, 比較的容易に K701・K901 と識別することが可能であると考えられる. また, 本法で識別できた酵母は製造工程中での酵母の管理にも有用である.

参考文献

- 1) 国税庁ホームページ <http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/shiori/2014/pdf/06.pdf#page=1> '酒類販売 (消費) 数量の推移'
- 2) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木隆仁, 岩口伸一; 奈良県工業技術センター研究報告, (35), 35-38, 2009
- 3) 福田央; 日本醸造協会誌, (109), 202-211, 2014
- 4) Shimizu, M., Miyashita, K., Kitagaki, H., Ito, K., and Shimoi, H.; J. Biosci. Bioeng., (100), 687-680, 2005
- 5) 福田央, 周延, 三上重明; 日本醸造協会誌, (107), 57-67, 2012